

خاصیت ایمنوپروفیلاکسی یک آنزیم پروتئولیتیک سرکر شیستوزوما مانسونی

دکتر حسین یوسفی*، دکتر مایک دانهوف**

چکیده:

یک پروتئاز سرکر شیتوزوما مانسونی مورد شناسایی قرار گرفت. وزن مولکولی این آنزیم ۲۷ kDa تعیین گردید و مطالعات بعدی نشان داد که فعالیت پروتئولیتیک آن با Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) از بین می‌رود، یعنی این که آنزیم مورد نظر یک سرین پروتئاز است. به منظور بررسی اثر ایمنوپروفیلاکسی آنزیم فوق ۱۸ موش آزمایشگاهی CBA با مخلوطی که پروتئاز سرکر اصلی ترین قسمت آن بود واکسینه شدند. سپس موشهای فوق و موشهای CBA گروه شاهد که فقط با ادجونت تزریق شده بودند به شیتوزوما مانسونی آلوده گردیدند. نهایتاً همه موش‌ها کشته شدند و تعداد کرم موجود در عروق خونی و تعداد تخم موجود در یک گرم کبد هر موش شمارش گردید. نتایج این بررسی نشان داد که ۵ موش از تعداد کل ۱۸ موش مورد آزمایش علیه آنزیم فوق تولید آنتی‌بادی نمودند اما موش‌هایی که ضد این پروتئاز آنتی‌بادی تولید نمودند به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نسبت به آلودگی به شیتوزوما مانسونی مصون شده بودند. در نتیجه به نظر می‌رسد در صورتی که به طریقی خاصیت ایمنونیزیتی آنزیم پروتئاز سرکر شیتوزوما افزایش داده شود این ماده می‌تواند به عنوان واکسن علیه شیتوزومیاژیس مطرح شود.

واژه‌های کلیدی: شیتوزوما مانسونی، سرکر، پروتئاز، واکسیناسیون

مقدمه:

زیادتی به این آنزیمها به عنوان یک واکسن برای کنترل شیتوزومیاژیس معطوف داشته‌اند. مطالعات قبلی نشان داده بود که یک مونوکونال آنتی‌بادی که با آنزیم پروتئولیتیک سرکر شیتوزوما با وزن مولکولی ۳۰ kDa واکنش نشان می‌داد برای سرکر در شرایط *in vitro* سایتوتوکسیک بوده است (۱۵). در این تحقیق یک پروتئاز سرکر شیتوزوما مانسونی شناسایی گردیده و خاصیت ایمنوپروفیلاکسیک آن مورد بررسی قرار گرفته است.

شیتوزوماها از دسته کرم‌های ترماتود بوده که باعث بیماری بیلارزیوز یا شیتوزومیاژیس در انسان می‌گردند. در حال حاضر حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا به این انگلها آلوده‌اند. سرکر شیتوزوماها که در آب آلوده قرار دارد داخل پوست انسان نفوذ کرده خود را به جریان خون می‌رساند و باعث آلودگی انسان می‌گردد. مشخص گردیده که آنزیمهای پروتئولیتیک سرکر شیتوزوما نقش تعیین کننده‌ای در نفوذ سرکر شیتوزوماها داخل پوست انسان دارند (۱۱،۷،۶،۵،۴،۱). به همین دلیل انگل شناسان توجه

*استادیار گروه انگل‌شناسی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

**استاد گروه انگل‌شناسی - دانشگاه ولز، بنگور انگلستان

مواد و روشها:

برای تهیه مخلوطی که حاوی آنزیم مورد نظر باشد سرکرها به تعداد بسیار زیاد در یک مایع کشت بافتی (Medium 199) قرار گرفتند و به صورت مصنوعی به شیتوزومولا تبدیل شدند (۲). این عمل باعث آزاد شدن آنزیمهای ترشحی سرکر شیتوزوما مانسونی داخل محیط فوق گردید. سپس این مایع با استفاده از اولترافیلتراسیون تا ده بار تغلیظ گردید. این مخلوط که از این به بعد CTF (Cercarial transformation fluid) نامیده می شود در طول تحقیق به عنوان منبع آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. موش های مورد استفاده در گروه آزمایش شامل ۱۸ موش CBA بودند که حدوداً ۶ هفته عمر داشتند. هر موش با ۰/۲cc از مخلوطی با حجم مساوی از CTF و ادجوانت (alum) از طریق داخل صفاقی واکسینه شد. گروه شاهد شامل ۱۲ موش CBA بود که مطابق برنامه موش های گروه آزمایش فقط با alum به عنوان ادجوانت تزریق شدند. واکسیناسیون پنج بار تکرار شد و بعد از هر تزریق از حیوان خونگیری شد و وجود آنتی بادی بر ضد آنزیم پروتئولیتیک سرکر با روش وسترن بلائینگ و الیزا مورد مطالعه قرار گرفت. روشهای SDS-PAGE، وسترن بلائینگ، الیزا و تعیین کلاس پروتئاز بر اساس آنچه در رفرانس شماره ۲ توضیح داده شده انجام گرفت.

سرانجام همه موش ها کشته شدند و تعداد کرم ها در عروق خونی و تعداد تخم ها در یک گرم از کبد هر کدام از موش ها شمارش گردیدند.

نتایج:

CTF که حاوی آنزیم پروتئولیتیک سرکر شیتوزوما مانسونی بود با روش وسترن بلائینگ و SDS-PAGE برای تعیین وزن مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. وقتی سرم حاوی آنتی بادی اختصاصی برای پروتئاز سرکر در وسترن ایمینوبلائینگ استفاده شد وزن مولکولی پروتئاز ۲۷ kDa تعیین گردید. این یافته با SDS-PAGE حاوی سویسترا مورد تأیید قرار گرفت. به این ترتیب که CTF روی SDS-PAGE حاوی سویسترای پروتئاز الکتروفورز شد و برای مدت چند ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شد. بعد از رنگ آمیزی مشخص شد که ناحیه ای که حاوی فعالیت پروتئولیتیک بوده وزن مولکولی آن ۲۷ kDa است. برای تعیین کلاس پروتئاز، CTF و یا پروتئاز تخلیص شده با اینهیستورهای مختلف مخلوط شدند و سرانجام مشخص شد که PMSF) Phenylmethanesulfonyl fluoride (قادر به از بین بردن فعالیت آنزیم پروتئاز است و این آزمایش نشان داد که پروتئاز سرکر از دسته سرین پروتئازها می باشد.

جدول شماره ۱: تعداد کرمها و تخم کرمها در موشهای تزریق شده با CTF همراه با تولید آنتی بادی (Responder)، تزریق شده با CTF بدون تولید آنتی بادی (Non-responder) و گروه شاهد

گروه	تعداد	میانگین تعداد کرم $\bar{X} \pm SD$	کاهش تعداد کرم %	P	میانگین تعداد تخم در یک گرم کبد $\bar{X} \pm SD$	تعداد کاهش تخم %	P
کنترل	12	114.7 ± 7.4	-	-	67.3 ± 1.1	-	-
Responder	5	60.6 ± 16.7	47	<0.001*	25.9 ± 10.5	62	<0.001*
Non-responder	13	100.2 ± 20.5	13	N.S	54.2 ± 7.1	20	N.S

N.S=non Significant (P>0.05)

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف می باشد.
* در مقایسه با گروه شاهد

از ۱۸ موش گروه آزمایش که با مخلوطی از CTF و ادجوانت تزریق شده بودند ۵ موش علیه آنزیم مورد نظر آنتی بادی تولید نمودند (Responder) و در بقیه آنها پاسخ ایمنی همورال با ELISA و وسترن بلاتینگ قابل سنجش نبود (Non-responder). نتایج مربوط به شمارش کرم در عروق خونی و تخم انگل در کبد در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

بحث:

در این تحقیق یک پروتئاز سرکر شیتوزوما مانسونی بررسی و خصوصیات آن شناسایی گردید. وزن مولکولی این آنزیم ۲۷kDa و از دسته سرین پروتئازهاست. نتایج آزمایشات بررسی خاصیت ایمینوپروپیلایکسی نشان داد که این پروتئاز از نظر ایمینولوژیکی ضعیف اما در مواردی که علیه آن تولید آنتی بادی شود موجب حفاظت موش‌ها در برابر آلودگی به شیتوزوما مانسونی می‌گردد. براساس مشخصات وزن مولکولی و کلاس پروتئاز مورد بررسی در این تحقیق، این آنزیم با آنزیمهایی که قبلاً در آزمایشگاههای مختلف از سرکر شیتوزوماها جدا سازی شده شباهتهای زیادی دارد (۸، ۹، ۱۰، ۱۳، ۱۴) با وجود اینکه پیشنهاد شده که فقط یک ژن مربوط به سرین پروتیز در شیتوزوماها وجود دارد (۱۲)، اما چهار توالی از این ژن تاکنون گزارش و ثبت شده است. از این چهار توالی سه تای آنها متفاوت بوده و چهارمی شباهت زیادی به یکی از آن سه توالی دارد (۱۳، ۱۶). بنابراین احتمالاً گزارش وجود چند پروتئاز مربوط به سرکر شیتوزوماها ممکن است به این دلیل باشد که آنها مربوط به چند ژن مختلف هستند و یا این که بعد از ساخته شدن آنزیم تغییراتی مانند گلیکوزاسیون در بعضی از آنها رخ می‌دهد و یا این که وجود چند آنزیم ممکن است به دلیل وجود سوشهای مختلف شیتوزوما باشد. تصور می‌شد آنزیمی که نقش اساسی در پدیده نفوذ

سرکر داخل پوست دارد (ایجاد آلودگی) می‌تواند هدف مطالعات تهیه واکسن برای شیتوزومیاژیس باشد. با این فرضیه که آنتی بادی موجود در بدن شخص ایمن به آنزیم متصل شده و پدیده نفوذ و در نتیجه ایجاد آلودگی را با مشکل مواجه می‌کند. لذا برای بررسی این فرضیه آزمایش واکسیناسیون موشها با مخلوطی که حاوی مقدار زیادی پروتئاز سرکر بود (CTF) طراحی شد. اولین مشکل در این آزمایش عدم پاسخ تعداد زیادی از موشهای واکسینه شده بود به طوری که ۱۳ موش از ۱۸ موش واکسینه شده پاسخ ایمنی همورال آنها قابل مشاهده با وسترن بلاتینگ و یا الیزا نبود. شاید این پدیده یکی از مکانیسمهای فرار شیتوزوماها از سیستم ایمنی میزبان باشد. به این صورت که انگل آنزیمی که نقش اساسی در ایجاد آلودگی دارد از نظر ایمینولوژیکی به صورت یک ایمونژن ضعیف ارائه می‌کند تا پاسخهای ایمنی میزبان مانع از آلودگی‌های بعدی نگردد. ضعف ایمینوژنیستی آنزیم پروتئولیتیک سرکر شیتوزوما مانسونی ممکن است دلایل مختلفی داشته باشد که به دو مورد آن اشاره می‌شود. تحقیقات قبلی نشان داده که وجود ترکیبات کربوهیدرات ممکن است در مهار پاسخهای ایمنی میزبان بر علیه شیتوزوما مانسونی مؤثر باشد (۱۷).

در این راستا مشخص شده آنزیم سرکر شیتوزوما مانسونی حاوی ترکیبات فوق است (۹). دومین دلیل ضعف ایمینوژنیستی آنزیم سرکر شیتوزوما مانسونی ممکن است به فرآیند عرضه آنتی ژن در سلولهای عرضه کننده آنتی ژن یا Antigen presenting cells (APC) مرتبط باشد. مشخص شده که در سلولهای APC پروتئازها در تولید پپتیدهایی که روی مولکولهای MHC عرضه می‌شوند نقش دارند (۳). به عبارت دیگر آنتی ژن وارد شده به داخل سلولهای APC، توسط پروتئازها به پپتیدهای کوچکی شکسته می‌شود. در شرایطی که آنتی ژن خودش یک پروتئاز است ممکن است تحت

شرایطی غیر عادی قرار گیرد. در این شرایط دو پروتئاز در APC موجود است یکی پروتئازی که به عنوان آنتی ژن وارد شده و دیگری پروتئازهای خود APC و در این میدان مسابقه باید دید کدام پروتئاز موفق به شکستن دیگری می گردد. بنابراین اگر پروتئاز سرکر شیتوزوما وارد شده داخل APC موفق به شکستن پروتئاز APC شود فرآیند تولید آنتی بادی را مختل می نماید. به هر حال موش هایی که علیه سرین پروتئاز مورد نظر تولید آنتی بادی نموده بودند در مقابل آلودگی شیتوزوما-مانسونی به صورت معنی داری مصونتر از گروه شاهد بودند.

References:

- 1- Campbell DL; Frappaolo PSF.; Stirewalt MA.; Dresden MH. *Schistosoma mansoni*: Partial characterization of enzymes secreted from the preacetabular glands of cercariae. *Exp Parasitol*, 40: 33-40, 1976.
- 2- Darani HY.; Curtis RHC.; Moneice C.; Price HP.; et al. *Schistosoma mansoni*, anomalous immunogenic properties of 27 kDa larval serine protease associated with protective immunity. *Parasitology*, 115: 237- 47, 1997.
- 3- DicK LR.; Aldrich C.; Jameson SC.; Moomaw CR.; et al. Proteolytic processing of ovalbumine and beta-galactosidase by the proteasome to yield antigenic peptides. *J Immunol*, 152: 3884-94, 1994.
- 4- Dresden MH.; Asch HL. Proteolytic enzymes in extracts of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Biochem Biophys Acta*, 289: 378-84, 1972.
- 5- Fallone PG.; Sturrock RF.; Niang M.; Capron A. Diminished susceptibility of a senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*, 53: 61-2, 1995.
- 6- Gazzinelli G.; Pellegrino J. Elastolytic activity of *Schistosoma mansoni* cercarial extract. *J Parasitol*, 50: 591-2, 1964.
- 7- Kloetzel KA. Collagenase-like substrate produced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*, 54:177-78, 1978.
- 8- Lands - Perger J.; Striwalt MA.; Dresden MH. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem J*, 201: 137-44, 1982.
- 9- Marikovsky M.; Arnon R.; Fishelson Z. Proteases secreted by the transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *J Immunol*, 141: 273-78, 1988.
- 10- Mckerrow JH.; Pino-Heiss S.; lindquist K.; Werb Z. Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Biol chem*, 260: 3703-7, 1985.
- 11- Mckerrow JH.; Doenhoff MJ. *Schistosome proteases*. *Parasitol Today*, 4: 334-40, 1988.
- 12- Mckerrow JH.; Newport G.; Fischelson Z. Recent insight into the structure and function of larval proteinase involved in host infection by a multicellular parasite. *Proc Soc Exp Biol Med*, 197: 119-24, 1991.
- 13- Newport GR.; Mckerrow JH.; Hedstrom R.; Pettitt M.; et al. Cloning of the proteinase that facilitates infection by *Schistosome parasites*. *J Biol chem*, 263: 13179-84, 1988.
- 14- Pierrot C.; Godin JL.; Liu A.; Capron A.; et al. *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle. *Parasitol*, 113: 519-20, 1996.

- 15- Pino Helss S.; Petitt M.; Beckstead SH.; Mckerrow J. Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercaria. Am J Trop Med Hyg, 35: 536-43, 1986.
- 16- Price HP.; Doenhoff.; Sayers JR. Cloning and expression of the three exons from a *Schistosoma cercarial* protease gene. Parasitol, 114: 139-47, 1997.
- 17- Yi XY.; Omer Ali P.; Kelly C.; Simpson AJ.; et al. IgM antibodies recognizing carbohydrate epitopes shared between schistosomula and miracidia of *Schistosoma mansoni* that block in vitro killing. J Immunol, 137: 3946-54, 1986.